(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0116243
(43) 공개일자 2023년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 12/14 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61L 2/18 (2006.01) *A61L 101/32* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 12/14 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0012928
(22) 출원일자 2022년01월28일
심사청구일자 2022년01월28일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
국립낙동강생물자원관
경상북도 상주시 도남2길 137 (도남동)
(72) 발명자
나병국
경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 102동 901호(주약동, 주약현대아파트)
정용태
경상북도 김천시 용전1로 9, 113동 1501호(율곡동, 엠코타운 더 플래닛)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 태웅

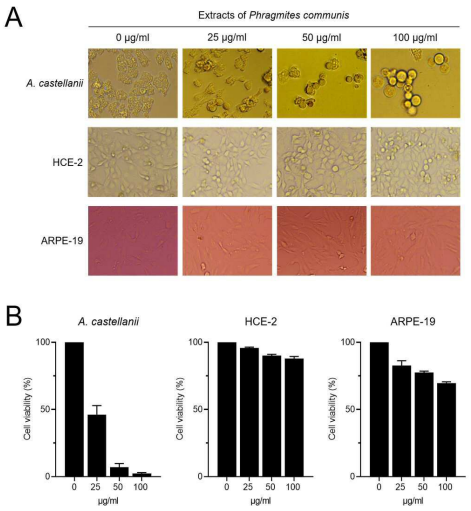
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **갈대 순 추출물을 이용한 가시아메바에 대한 항아메바 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 사람 각막 상피세포인 HCE-2와 사람 망막세포인 ARPE-19에 대해서는 특별한 세포독성을 보이지 않으면서, 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.)에 대해서는 높은 항아메바 효과를 갖는 갈대 순 추출물을 이용한 항아메바용 조성물을 개시한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 36/899 (2013.01)
A61L 2/18 (2013.01)
A61P 33/04 (2018.01)
A61L 2101/32 (2020.08)
A61L 2202/17 (2013.01)
(72) 발명자
황병수
경상북도 상주시 중앙로 178-27, 101동 205호(남성동)
오영택
경상북도 상주시 냉림4길 27-6, 104동 1801호(냉림동, 북천대림다미아)
이영경
경상북도 상주시 경상대로 2930-10, 103동 608호(낙양동, 낙양동명지아파트)
황용
경기도 안산시 단원구 원초로 90, 107동 602호(초지동)
박진희
경상남도 산청군 산청읍 중앙로 41, 101동 901호(산청삼한사랑채)
최지수
경상북도 경주시 충효1길 8, 101동 604호(충효동, 충효신원아침도시아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

갈대 순 추출물을 유효성분으로 포함하는 가시아메바에 대한 항아메바 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 가시아메바는 카스텔란 가시아메바(*Acanthamoeba castellanii*)인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 (Ⅰ) 내지 (Ⅲ) 중 어느 하나의 추출물인 조성물:

(Ⅰ) 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 추출물;

(Ⅱ) 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올로 분획하여 얻어진 추출물; 및

(Ⅲ) 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차적으로 분획하여 얻어진 추출물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 콘택트렌즈 세척액 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 콘택트렌즈 보존액 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

갈대 순 추출물을 유효성분으로 하는, 가시아메바 감염증 개선용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 가시아메바는 카스텔란 가시아메바(*Acanthamoeba castellanii*)인 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 추출물은 (Ⅰ) 내지 (Ⅲ) 중 어느 하나의 추출물인 조성물:

(Ⅰ) 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 추출물;

(Ⅱ) 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올로 분획하여 얻어진 추출물; 및

(Ⅲ) 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차적으로 분획하여 얻어진 추출물.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 갈대(*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) 순 추출물을 이용한 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.)에 대한 항아메바 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 아메바는 원생동물(운동성을 가진 단세포동물)의 하나로 박테리아나 플랑크톤을 섭취한 후 어류의 먹이가 돼 영양분을 공급하는 등 수(水)생태계의 물질 순환에 중요한 역할을 하며, 동물과 균류의 조상으로 알려져 있다. 자연환경 내 토양이나 연못, 하수, 수영장이나 공기 중에서 서식하는 자유생활아메바 중 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.)와 나이글레리아(*Naegleria* spp.)는 인체에서 육아종성 아메바성 뇌염(Granulomatous amoebic encephalitis;GAE) 및 원발성 아메바성 수막뇌염(Primary amoebic meningoencephalitis;PAM)을 일으킴이 밝혀졌으며, 그 후 여러 연구자들에 의해 자연환경 속 및 인체의 뇌로부터 분리, 배양되어 병원성이 인정되고 아메바의 종(Species)이 동정되었다(Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 42:191-198, 1948, Am. J. Clin. Pathol. 50:568-574, 1968, Ann. Rev. Microbiol., 25:231-254, 1971, J. Protozool., 32:571-575, 1985, Am. J. Clin. Patho., (May):591-594, 1979).

[0004] 특히 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.)는 토양과 수돗물을 포함한 담수 등 다양한 지구환경에 서식하는 자유생활아메바이나 사람에 기회 감염 되어 아메바성 각막염과 뇌염 등의 감염질환을 유발한다. 우리나라에서도 서울시내 하수 및 웅덩이에서 분리 동정되어 병원성이 있음을 입증한 바 있다(임상병리검사과학회지: 제34권 제2호, 8-87, 2002). 최근 시력교정 또는 미용 목적의 콘택트렌즈 사용이 증가함에 따라 콘택트렌즈 사용자를 중심으로 아메바성 각막염의 발생률이 꾸준히 증가하고 있으며 국내 각막염 환자의 총 2~3%를 차지한다. 아메바성 각막염은 치료효과가 입증된 치료제가 없어 치료가 어렵고 각막 손상이 심한 경우 실명에 이를 수 있다. 아메바성 각막염의 치료법으로는 염산폴리헥사메틸렌 비구아니드(polyhexamethylene biguanide; PHMB)나 클로르헥시딘(chlorhexidine) 등의 소독약을 희석해서 점안하는 것이 일반화된 치료 방법이나 치료를 하더라도 악화되어 실

명에 따른 각막이식이 필요한 경우도 발생한다. 시판 중인 대다수의 렌즈세척보존액에는 가시아메바 살균을 목적으로 저농도의 PHMB가 함유되어 있으나 PHMB는 사회적 이슈가 된 가습기 살균제의 폴리헥사메틸렌 구아니딘(PHMG)과 화학구조가 매우 유사하여 안정성에 대한 우려가 잔존한다. 또한 PHMB는 가시아메바 영양형(trophozoites)에 대한 사멸효과는 입증되었으나 포낭형(cysts)의 가시아메바에 대해 사멸효과를 나타내지 않았다.

[0005] 본 발명은 전술한 바의 배경 하에서, 갈대 순 추출물의 가시아메바 (*Acanthamoeba* spp.)에 대한 항아메바 활성을 개시한다.

[0006]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 갈대 순 추출물을 이용한 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.)에 대한 항아베마 조성물을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 갈대 순 추출물을 이용한 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.)의 감염증에 대한 개선용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 아래의 실시예 및 실험예에서 확인되는 바와 같이, 갈대 순 추출물이 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.), 특히 카스텔란 가시아메바(*Acanthamoeba castellanii*)에 대한 높은 항아메바 효과를 가짐을 확인함으로서 완성된 것이다.

[0012] 전술한 바를 고려할 때, 본 발명은 일 측면에 있어서, 갈대 순 추출물을 유효성분으로 하는, 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.)에 대한 항아메바 조성물로 파악할 수 있고, 다른 측면에 있어서는 갈대 순 추출물을 유효성분으로 하는, 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.)의 감염증에 대한 개선용 조성물로 파악할 수 있다.

[0013] 본 명세서에서, "갈대 순 추출물"이란 추출 대상인 갈대 순의 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 메틸렌클로라이드, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 침출하여 얻어진 추출물, 이산화탄소, 펜탄 등 초임계 추출용매를 사용하여 얻어진 추출물 또는 그 추출물을 분획하여 얻어진 분획물을 의미하며, 추출 방법은 활성물질의 극성, 추출 정도, 보존 정도를 고려하여 냉침, 환류, 가온, 초음파 방사, 초임계 추출 등 임의의 방식이 적용될 수 있다. 분획된 추출물의 경우 상기 추출물을 특정 용매에 현탁시킨 후 극성이 다른 용매와 혼합·정치시켜 얻은 분획물, 상기 추출물을 실리카겔 등이 충진된 칼럼에 흡착시킨 후 소수성 용매, 친수성 용매 또는 이들의 혼합 용매를 이동상으로 하여 얻은 분획물을 포함하는 의미이다. 또한 상기 추출물의 의미에는 동결건조, 진공건조, 열풍건조, 분무건조 등의 방식으로 추출 용매가 제거된 농축된 액상의 추출물 또는 고형상의 추출물이 포함된다. 바람직하게는 추출용매로서 물, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 얻어진 추출물, 더 바람직하게는 추출용매로서 물과 에탄올의 혼합 용매를 사용하여 얻어진 추출물과, 그 추출물은 물에 현탁하고 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및/또는 부탄올로 분획하여 얻어진 추출물을 의미한다. 이때 분획은 상기 열거된 용매 순으로 순차적으로 이루어질 수 있다. .

[0014] 또 본 명세서에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.

[0015] 또 본 명세서에서, "항아베마"는 아베마의 사멸 효과 및/또는 증식 억제 효과를 포함하는 의미한다.

[0016] 또 본 명세서에서, "가시아메바(*Acanthamoeba* spp.) 감염증"은 전술한 바와 같이 아메바성 각막염과 뇌염 등을 의미한다.

[0017] 또 본 명세서에서, "감염증 개선"이란 그 증상의 경감, 예방 또는 치료를 의미한다.

[0018] 본 발명의 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.)에 대한 항아메바용 조성물 또는 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.) 감염증의 예방 또는 치료용 조성물에서, 그 유효성분은 그것의 해당 아메바에 대한 항아메바 활성, 해당 아메바의 감염증에 대한 예방 또는 치료 활성을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 20.0 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 그 적용 대상인 포유동물 바람직하게는 사람에게 의사, 약사 등 의료 전문가 등의 제언에 의한 투여 기간 동안 본 발명의 조성물이 투여될 때, 해당 아메바의 항아메바 효과, 해당 아메바 감염증 개선 효과 등 의도한 의료적·약리학적 효과를 나타낼 수 있는, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

[0019] 본 발명의 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다.

[0020] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서, 약제학적 조성물로 파악할 수 있다.

[0021] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 투여 경로는 국소 경로, 경구 경로, 정맥 내 경로, 근육 내 경로, 및 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하는 임의의 적절한 경로일 수 있으며, 두 가지 이상의 경로를 조합하여 사용할 수도 있다. 두 가지 이상 경로의 조합의 예는 투여 경로에 따른 두 가지 이상의 제형의 약물이 조합된 경우로서 예컨대 1차로 어느 한 약물은 정맥 내 경로로 투여하고 2차로 다른 약물은 국소 경로로 투여하는 경우이다.

[0022] 약학적으로 허용되는 담체는 투여 경로나 제형에 따라 당업계에 주지되어 있으며, 구체적으로는 "대한민국약전"을 포함한 각국의 약전을 참조할 수 있다.

[0023] 본 발명의 약제학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 덱스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유, 에탄올, 글리세롤 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라 적절한 결합제, 윤활제, 붕해제, 착색제, 희석제 등을 포함시킬 수 있다. 적절한 결합제로서는 전분, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 글루코스, 옥수수 감미제, 소듐 알지네이트, 폴리에틸렌 글리콜, 왁스 등을 들 수 있고, 윤활제로서는 올레산나트륨, 스테아르산나트륨, 스테아르산마그네슘, 벤조산나트륨, 초산나트륨, 염화나트륨, 실리카, 탈쿰, 스테아르산, 그것의 마그네슘염과 칼슘염, 폴리데틸렌글리콜 등을 들 수 있으며, 붕해제로써는 전분, 메틸 셀룰로스, 아가(agar), 벤토나이트, 잔탄검, 전분, 알긴산 또는 그것의 소듐 염 등을 들 수 있다. 또 희석제로서는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 소비톨, 셀룰로스, 글라이신 등을 들 수 있다.

[0024] 본 발명의 약제학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 수성 등장 용액 또는 현탁액을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니멘트제, 에어롤제 등의 형태로 제제화할 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화할 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 담체로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리에틸렌글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등을 사용할 수 있다.

[0025] 약제학적 조성물의 구체적인 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주 된다.

[0026] 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에

따라 1일 0.001mg/kg ~ 10g/kg 범위, 바람직하게는 0.001mg/kg ~ 1g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[0027] 본 발명의 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로 파악할 수 있다.

[0028] 본 발명의 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 예컨대 차, 주스, 탄산음료, 이온 음료 등의 음료류, 우유, 요구르트 등의 가공 유류, 껌류, 떡, 한과, 빵, 과자, 면 등의 식품류, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류 등으로 제조될 수 있다.

[0029] 또 본 발명의 식품 조성물은 법률상·기능상의 구분에 있어서 제조·유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품 구분을 띨 수 있다. 예컨대 한국 「건강기능식품에 관한 법률」에 따른 건강기능식품이거나, 한국 「식품위생법」의 식품공전(식약처 고시 「식품의 기준 및 규격」)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다.

[0030] 본 발명의 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 식품첨가물이 포함될 수 있다. 식품첨가물은 일반적으로 식품을 제조, 가공 또는 보존함에 있어 식품에 첨가되어 혼합되거나 침윤되는 물질로서 이해될 수 있는데, 식품과 함께 매일 그리고 장기간 섭취되므로 그 안전성이 보장되어야 한다. 식품의 제조·유통을 규율하는 각국 법률(한국에서는 「식품위생법」임)에 따른 식품첨가물공전에는 안전성이 보장된 식품첨가물이 성분 면에서 또는 기능 면에서 한정적으로 규정되어 있다. 한국 식품첨가물공전(식약처 고시 「식품첨가물 기준 및 규격」)에서는 식품첨가물이 성분 면에서 화학적 합성품, 천연 첨가물 및 혼합 제제류로 구분되어 규정되어 있는데, 이러한 식품첨가물은 기능 면에 있어서는 감미제, 풍미제, 보존제, 유화제, 산미료, 점증제 등으로 구분된다.

[0031] 감미제는 식품에 적당한 단맛을 부여하기 위하여 사용되는 것으로, 천연의 것이거나 합성된 것 모두 본 발명의 조성물에 사용할 수 있다. 바람직하게는 천연 감미제를 사용하는 경우인데, 천연 감미제로서는 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 당 감미제를 들 수 있다.

[0032] 풍미제는 맛이나 향을 좋게 하기 위하여 사용될 수 있는데, 천연의 것과 합성된 것 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 천연의 것을 사용하는 경우이다. 천연의 것을 사용할 경우에 풍미 이외에 영양 강화의 목적도 병행할 수 있다. 천연 풍미제로서는 사과, 레몬, 감귤, 포도, 딸기, 복숭아 등에서 얻어진 것이거나 녹차잎, 둥굴레, 댓잎, 계피, 국화 잎, 자스민 등에서 얻어진 것일 수 있다. 또 인삼(홍삼), 죽순, 알로에 베라, 은행 등에서 얻어진 것을 사용할 수 있다. 천연 풍미제는 액상의 농축액이나 고형상의 추출물일 수 있다. 경우에 따라서 합성 풍미제가 사용될 수 있는데, 합성 풍미제는 에스테르, 알콜, 알데하이드, 테르펜 등이 이용될 수 있다.

[0033] 보존제로서는 소듐 소르브산칼슘, 소르브산나트륨, 소르브산칼륨, 벤조산칼슘, 벤조산나트륨, 벤조산칼륨, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 등이 사용될 수 있고, 또 유화제로서는 아카시아검, 카르복시메틸셀룰로스, 잔탄검, 펙틴 등을 들 수 있으며, 산미료로서는 연산, 말산, 푸마르산, 아디프산, 인산, 글루콘산, 타르타르산, 아스코르브산, 아세트산, 인산 등이 사용될 수 있다. 산미료는 맛을 증진시키는 목적 이외에 미생물의 증식을 억제할 목적으로 식품 조성물이 적정 산도로 되도록 첨가될 수 있다.

[0034] 점증제로서는 현탁화 구현제, 침강제, 겔 형성제, 팽화제 등이 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 식품 조성물은 전술한 바의 식품첨가물 이외에, 기능성과 영양성을 보충, 보강할 목적으로 당업계에 공지되고 식품첨가물로서 안정성이 보장된 생리활성 물질이나 미네랄류를 포함할 수 있다.

[0036] 그러한 생리활성 물질로서는 녹차 등에 포함된 카테킨류, 비타민 B1, 비타민 C, 비타민 E, 비타민 B12 등의 비타민류, 토코페롤, 디벤조일티아민 등을 들 수 있으며, 미네랄류로서는 구연산 칼슘 등의 칼슘 제제, 스테아린산마그네슘 등의 마그네슘 제제, 구연산철 등의 철 제제, 염화 크롬, 요오드칼륨, 셀레늄, 게르마늄, 바나듐, 아연 등을 들 수 있다.

[0037] 본 발명의 식품 조성물에는 전술한 바의 식품첨가물이 제품 유형에 따라 그 첨가 목적을 달성할 수 있는 적량으로 포함될 수 있다.

[0038] 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품첨가물과 관련하여서는 각국 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물, 특히 항아베마 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서, 컨택트 렌즈 세척액 조성물로 파악할 수 있다.

[0040] 본 발명의 컨택트 렌즈 세척액 조성물에는 그 유효성분 이외에 킬레이트화제, 계면활성제, 보습제, 증점제, 등장화제, 항미생물제 등 일반적으로 사용되는 첨가제 또는 성분 등이 추가될 수 있다.

[0041] 세척 작용을 갖는 계면활성제로는 이 분야에서 공지된 성분들을 제한 없이 사용할 수 있으며, 양성(amphoteric), 양이온성, 음이온성, 비이온성, 또는 양쪽성 계면활성화제를 비롯하여 1종 또는 그 이상의 계면활성화제를 사용할 수 있다. 본 발명에 포함되는 음이온 계면활성화제로는 분자량 5,000 이상의 다당류와 비이온성 계면활성화제를 포함한다. 단백질 침착물에 대한 우수한 세정 효과를 갖는 다당류로는 히알우론산나트륨과 콘드로이친황산염을 들 수 있으며, 생체 유래성 다당류로서 렌즈에 부착되는 단백질을 효과적으로 제거할 뿐만 아니라, 윤활과 보습에도 효과가 있다. 비이온성 계면활성화제로는 폴리옥시프로필렌블록공중합체인 폴록사머류와 폴리소르베이트류 등을 포함한다. 비이온성 계면활성제로는 특히 폴리옥시프로필렌블록공중합체 중 분자량 8,000~20,000을 갖는 물질로 폴록사머188이나 폴록사머 407이 바람직하다. 또한 양쪽성 계면활성화제로는 코코아미도베타인 같은 지방산 아미드류를 포함할 수 있다. 상기 계면활성제는 조성물 총 중량에 대하여0.01~20.0 중량%의 함량으로 포함될 수 있으며, 상기와 같은 범위로 포함되는 경우에 세척력이 향상되고, 눈 점막 자극에 의한 염증 유발 및 고점도로 인한 사용상의 불편을 피할 수 있다.

[0042] 렌즈의 습윤과 윤활, 착용감을 높이기 위한 보습제로는 이 분야에서 공지된 성분들을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들면, 셀룰로오스계열의 물질로 히드록시메칠셀룰로오스, 히드록시에칠셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 메칠셀룰로오스, 히드록시에칠메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등을 들 수 있으며, 기타 폴리비닐알코올이나 폴리옥시에틸렌, 글리세린, 소르비톨, 폴리쿼터늄-10 등을 들 수 있다. 이들은 1종 단독으로 또는 2종 이상이 함께 사용될 수 있으며, 바람직하게는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 폴리쿼터늄-10, 히드록시메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올 등이 사용될 수 있다. 상기 보습제는 조성물 총 중량에 대하여 0.05~2.0 중량%의 함량으로 포함되는 것이 바람직하다.

[0043] 증점제로는 이 분야에서 공지된 성분들을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예컨대, 히드록시에틸메틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로스, 포비돈, 폴리비닐 알코올 등이 사용될 수 있으며, 이들 중에서 히드록시프로필메틸셀룰로오스가 바람직하다. 상기 증점제는 조성물 총 중량에 대하여0.01~4.0 중량%의 함량으로 포함되는 것이 눈에 대한 충격 완화 및 렌즈 착용자의 착용감 향상의 측면에서 바람직하다.

[0044] 등장화제로는 이 분야에서 공지된 성분들을 제한 없이 사용할 수 있으며, 염화나트륨, 염화칼륨등이 바람직하게 사용될 수 있다. 상기 등장화제는 조성물 총 중량에 대하여 0.1~5.0 중량%의 함량으로 포함되는 것이 바람직하다.

[0045] 본 발명의 조성물, 특히 본 발명의 항아베마 조성물은 또 다른 구체적인 양태에 있어서, 컨택트 렌즈 보존액 조성물로 파악할 수 있다.

[0046] 본 발명의 컨택트 렌즈 보존액 조성물에는 그 유효성분 이외에 킬레이트화제, 항미생물제 등 일반적으로 사용되는 첨가제 또는 성분 등이 추가될 수 있다.

[0047] 상기 첨가제 중 킬레이트화제는 세균의 양이온(cation)과 킬레이팅하여 살균력을 보강하며, 단백질 침전물 및 금속 이온 등과 결합하여 이들을 제거하는 등의 역할을 한다. 상기 킬레이트화제로는 이 분야에서 공지된 성분들을 제한 없이 사용할 수 있으며, 유기산의 종류나 아민 등이 유용하다. 구체적인 예로는 구연산, 폴리포스페이트(polyphosphate), 주석산, 니트릴로 트리아세트산, 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산, 히드록시에틸 에틸렌디아민 트리아세트산, 1,2-디아미노시클로헥산, 1,2-디아미노시클로헥산 테트라아세트산, N,N,N,N-테트라 아세트산(EGTA) 중의 에틸렌 글리콜 비스(β-아미노에틸 에테르), 아미노 디아세트산 및 히드록시에틸 아미노 디아세트산 등이 있다. 이들 산은 그것의 수용성염, 구체적으로 그것의 알칼리 금속염 형태로 사용될 수 있다. 특히 바람직한 킬레이트화제는 에틸렌 디아민 테트라아세트산(EDTA)의 디,트리, 및 테트라-소듐염이며, 이중에서도 디소듐 EDTA(디소듐 에데테이트)가 가장 바람직하다. 상기 킬레이트화제는 조성물 총 중량에 대하여 0.001~0.5 중량%로 포함되는 것이 조성물의 안정성 및 항미생물 활성 측면에서 바람직하다.

[0048] 본 조성물에는 미생물을 억제하는 농도의 항미생물제를 포함할 수 있다. 항미생물제로는 이 분야에서 공지된 항미생물 활성을 갖는 물질을 더 포함할 수 있다. 이러한 항미생물 활성 물질로는 클로로헥시딘, 벤잘코늄 클로라이드, 티메로졸, 알킬 트리에탄올아민, 페닐머큐릭 염, 4차 암모늄 화합물(브롬화 세틸트리메틸 암모늄, 염화세틸피리디늄 및 염화 벤즈알코늄, 바람직하게는 염화 벤즈알코늄), 폴리쿼터늄 공중합체, 벤질알콜, 미리스타미도프로필 디메틸아민(Myristamidopropyl Dimethylamine), 소듐머큐로티올레이트, 클로로부탄, 폴리에틸렌이민, 알렉시딘, 헥세티딘, 브로노폴, 라우르디모늄하이드록시프로필하이드롤라이즈드콜라겐(lauryldimonium

hydroxypropyl hydrolyzed collagen), 코코디모늄하이드록시프로필하이드롤라이즈드콜라겐(cocodimonium hydroxypropyl hydrolyzed collagen), 스테아릴디모늄하이드록시프로필하이드롤라이즈드콜라겐(stearyldimonium hydroxypropyl hydrolyzed collagen), 폴리[옥시에틸렌(디메틸이미노)에틸렌(디메틸이미노)에틸렌디클로라이드](poly[oxyethylene(dimethylimino)ethylene(dimethylimino)ethylene dichloride], 폴리디메틸디알릴암모늄 클로라이드, 및 이들의 염을 들 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 활성물질들의 적합한 염으로는 글루코네이트, 이세티오네이트, 2-히드록시에탄술포네이트, 포르메이트, 아세테이트, 글루타메이트, 숙시네이트, 모노디글리콜레이트, 메탄술포네이트, 락테이트, 이소부티레이트, 나이트레이트, 및 글루코헵토네이트 염을 들 수 있다. 안과적으로 사용되는 상기 폴리쿼터늄 중합체의 예로는 오닉스 코포레이션(Onyx corporation)에서 시판되는 폴리쿼터늄1을 들 수 있다. 상기 항미생물 활성성분은 조성물 총 중량에 대하여 0.01~100.0 ppm의 함량으로 포함될 수 있다.

[0049] 본 발명의 갈대 순 추출물을 이용한 항아메바 조성물은 모든 종류의 콘택트렌즈, 예컨대, 하드 렌즈, 소프트 렌즈 등에 적용될 수 있다. 본 발명의 갈대 순 추출물을 이용한 항아메바 조성물은 습윤 용액, 침지(soaking) 용액, 세척 및 조절 용액 뿐만 아니라 다목적 유형의 렌즈 관리 용액(멀티액) 등 모든 종류의 콘택트렌즈 관리 용액으로 사용될 수 있다. 상기 조성물은 눈 밖에서 또는 눈 안에서, 예를 들면 액적 형태로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0051] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 갈대 순 추출물을 이용한 가시아메바 (*Acanthamoeba* spp.)에 대한 항아메바용 조성물, 및 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.) 감염증에 대한 치료 또는 예방용 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 조성물은 약품, 기능성 식품, 콘텍트렌즈 세척제나 보존제 등으로 제품화될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 갈대 순 추출물이 가시아메바, 사람 각막 상피세포인 HCE-2와 사람 망막세포인 ARPE-19의 형태학적 변화[도 1A]와 세포사멸[도 1B]에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 2는 갈대 순 추출물이 가시아메바의 미세 세포구조 변화에 미치는 영향을 투과전자현미경으로 관찰한 결과이다.

도 3은 갈대 순 추출물 분획에 따른 가시아메바에 대한 항아메바 효과를 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] **<실시예> 갈대 순 추출물의 항아메바성 조성물의 용도**

[0057] **1-1. 시료 준비(갈대 순 추출물, 물, 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산)**

[0058] 갈대 순(전초) 건조 분쇄물 3kg에 60L의 70% 에탄올을 가하고, 24시간 동안 상온에서 추출한 후, 1시간 초음파를 방사하였다. 추출액을 여과지(Whatman No 2)로 여과하고, 남은 잔사를 재추출하여 여과하였으며, 그 여과액을 감압농축하고 동결건조하여 고형상 갈대순 추출물 204.1g을 얻었다. 상기 추출물을 물로 현탁시킨 후, 여기에 동량의 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, n-부탄올로 순차적으로 분획하여, 헥산 분획물(HX, 30.0g), 클로로포름 분획물($CHCl_3$, 3.8g), 에틸아세테이트 분획물(EA, 5.6g), 부탄올 분획물(BuOH, 12.7g) 및 잔여 물층 분획물 (H_2O, 152.0g)을 얻었다.

[0059] **1-2. 가시아메바의 배양**

[0060] 본 발명에 사용한 가시아메바는 American Type Culture Collection에서 구입한 *Acanthamoeba castellanii* Castellanii strain(ATCC No. 30011)이며, 가시아메바는 Peptone-Yeast extract-Glucose 배지(PYG 배지; 2% proteose peptone, 0.2% yeast extract, 0.1M glucose, 4mM $MgSO_47H_2O$, 0.4mM $CaCl_2$, 3.4mM sodium

citrate$2H_2O$, 50uM $Fe(NH_4)_2(SO_4)6H_2O$, 2.5mM KH_2PO_4, 2.5mM Na_2HPO_4, pH 6.5)에 넣어 25℃ 배양기에서 무균 배양하며 연구에 사용하였다.

[0061] **1-3. 갈대 순 추출물의 가시아메바에 대한 항아메바 활성 평가**

[0062] 갈대 순 추출물의 가시아메바에 대한 항아메바 효과(아메바 사멸 효과)는 현미경을 활용한 형태학적 변화와 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit (Promega, USA)를 이용하여 분석하였다. PYG 배지에서 배양한 가시아메바 영양형을 96-웰 마이크로플레이트(well microplate)에 접종($1x10^5$ cells/well)한 후 실온에서 배양하였다. 배양된 가시아메바에 갈대 순 추출물 또는 분획을 다양한 농도(1~200 μg/ml)로 처리한 후 실온에서 24 또는 48시간 동안 배양하였다. 갈대 순 추출물 또는 분획을 첨가하지 않고 동일한 조건에서 배양한 가시아메바를 대조군으로 사용하였다. 배양 후 가시아메바의 사멸정도는 현미경 관찰과 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit(Promega)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다. 모든 실험은 최소 3배수 반복실험을 실시하였고 평균값과 표준편차를 계산하였다.

[0063] **1-4. 갈대 순 추출물의 사람 각막 상피세포와 사람 망막세포에 대한 세포독성 평가**

[0064] 갈대 순 추출물의 정상세포 독성 측정을 위한 대조군 세포로 사람 각막 상피세포인 HCE-2(ATCC CRL-11135)와 사람 망막세포인 ARPE-19(ATCC CRL-2302)를 사용하였다. HCE-2 세포는 0.05 mg/ml bovine pituitary extract(BPE)와 5 ng/ml epidermal growth factor(EGF)가 포함된 Keratinocyte-Serum Free Medium(Gibco 17005-042)에서 배양하며 연구에 사용하였다. ARPE-19 세포는 10% Fetal bovine serum(FBS; Gibco), 1% 페니실린(Sigma)과 1% 스트렙토마이신(Sigma)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco)을 이용하여 배양하였다.

[0065] 세포는 96-웰 마이크로플레이트(well microplate)에 접종(2×10^4 cells/ well)한 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포에 갈대 순 추출물 또는 분획을 다양한 농도(1~200 μg/ml)로 처리한 후 37℃ 배양기에서 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 갈대 순 추출물 또는 분획을 첨가하지 않고 동일한 조건에서 배양한 세포는 대조군으로 사용하였다. 배양 후 세포독성은 현미경 관찰과 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit(Promega)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다. 모든 실험은 최소 3 반복 실험을 실시하였고 평균값과 표준편차를 계산하였다.

[0066] **1-5. 투과전자현미경을 이용한 갈대 순 추출물에 의한 가시아메바의 형태학적 변화 관찰**

[0067] 갈대 순 추출물에 의해 유도되는 가시아메바의 형태학적 변화와 사멸효과의 연계성을 분석하기 위하여 투과전자현미경(Transmission Electron Microscopy; TEM)을 이용하여 갈대 순 추출물에 의해 유도되는 가시아메바의 미세 세포구조 분석을 실시하였다.

[0068] 갈대 순 추출물(20, 50 μg/ml)을 가시아메바에 처리한 후 24시간 실온에서 배양하였다. 가시아메바는 수집하여 2% glutaraldehyde 용액으로 고정하고 후고정액(OsO4)으로 추가 고정하였다. 가시아메바는 propylene과 epon 혼합액으로 탈수시킨 다음 epoxy resin을 이용하여 포매하고 블록을 제작하였다. 절편은 ultramicrotome으로 1 μg 두께로 제작하고 구리 grid에 도포한 후 경상국립대학교 공동실험실습관의 Talos L120C Cryo Bio 120kV Transmission Electron Microscope (Thermo)로 관찰하였다.

[0069] **2. 실험결과**

[0070] **2-1. 갈대 순 추출물의 가시아메바에 대한 항아메바 효과**

[0071] 가시아메바에 갈대 순 추출물을 다양한 농도(0, 25, 50, 100 μg/ml)로 첨가하여 반응시킨 후 가시아메바의 형태학적 변화와 생존률을 분석한 결과 가시아메바의 형태학적 변화가 유도되었으며(도 1A 참조) 생존률은 갈대 순 추출물의 양에 비례하여 크게 감소하였다(도 1B 참조). 따라서 갈대 순 추출물은 가시아메바의 형태학적 변화와 사멸을 유도함을 알 수 있었다.

[0072] **2-2. 갈대 순 추출물의 사람 각막 상피세포와 사람 망막세포에 대한 세포독성 평가 결과**

[0073] 대조군 세포에 대한 갈대 순 추출물의 세포독성효과 분석을 위해 사람 각막상피세포(HCE-2)와 망막세포(ARPE-19)에 다양한 농도(0, 25, 50, 100 μg/ml)의 갈대 순 추출물을 첨가하여 반응시킨 후 세포의 형태학적 변화와 생존률을 분석한 결과 두 종류 세포 모두에서 특이적인 형태학적 변화가 유도되지 않았으며, 가시아메바의 사멸효과가 관찰된 고농도(50, 100 μg/ml)의 갈대 순 추출물을 처리하였을 경우에도 70% 이상의 생존률을 나타내었

다(도 1A, 도1B 참조). 따라서 갈대 순 추출물의 대조군 세포에 대한 독성은 경미하였다.

[0074] **2-3. 갈대 순 추출물에 의한 가시아메바의 미세 세포구조 변화**

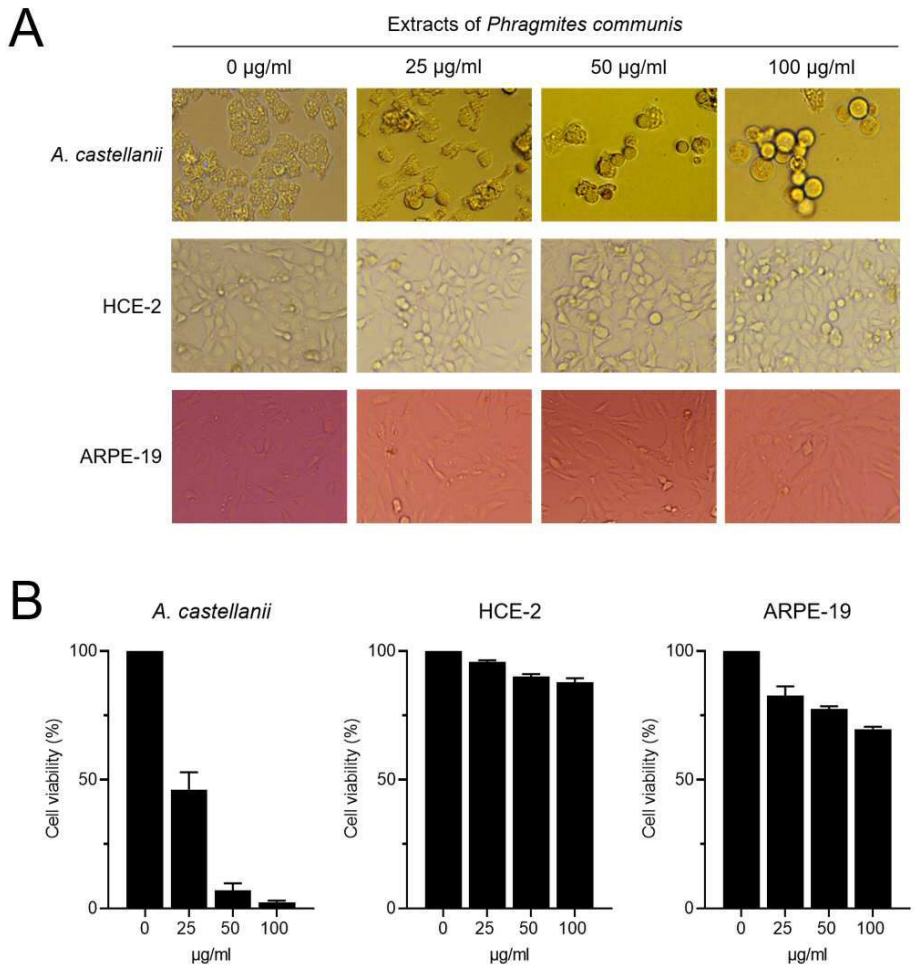
[0075] 갈대 순 추출물을 처리한 가시아메바 세포 내에 비정상적인 액포(vacuoles)와 미토콘드리아(mitochondria)의 증가가 관찰되었다(도 2). 또한 고농도(50 μg/ml)의 갈대 순 추출물을 처리한 경우 비정상적인 포낭형성(encystation) 과정이 유도되는 것으로 관찰되었다(도 2). 따라서 갈대 순 추출물은 가시아메바의 정상적인 생리기전을 방해하여 비정상적인 포낭형성을 유도하고 사멸에 이르게 하는 것으로 추정된다.

[0076] **2-4. 갈대 순 추출물 분획에 따른 가시아메바에 대한 항아메바 효과**

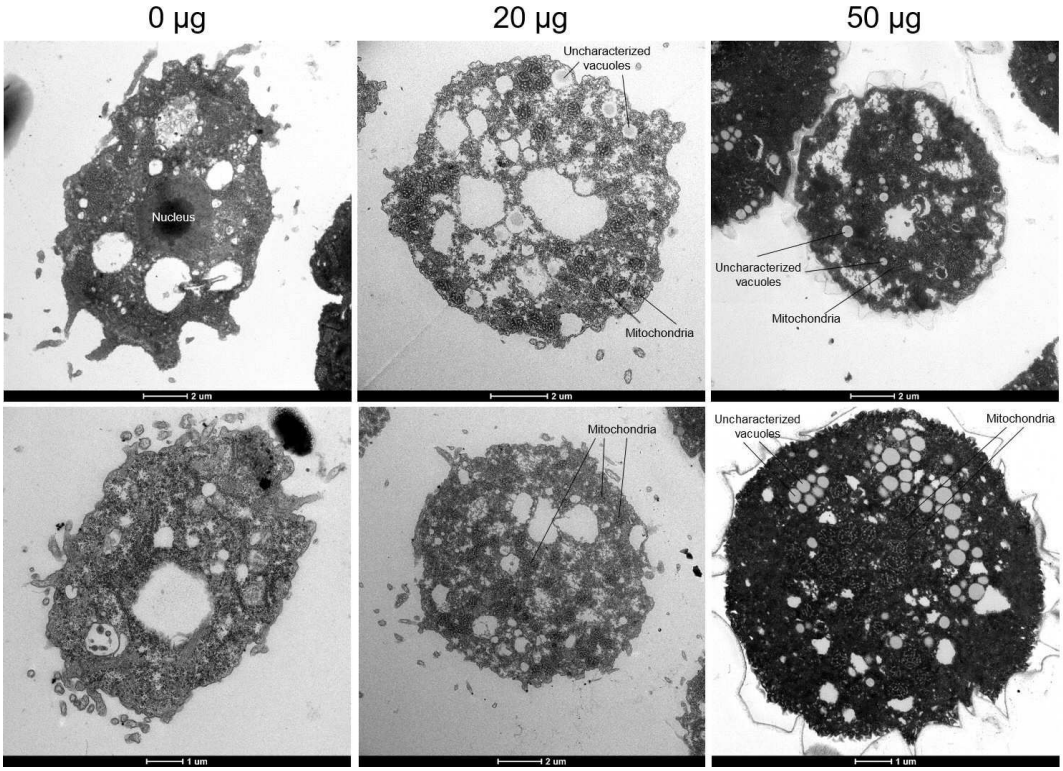
[0077] 갈대 순 추출물의 다양한 분획 물(H_2O), 부탄올(BuOH), 에틸아세테이트(EA), 클로로포름($CHCl_3$), 헥산(HX)을 다양한 농도(100, 150, 200 μg/ml)로 첨가하여 반응시킨 후 가시아메바의 생존률을 분석한 결과, 모든 분획물이 항아메바 효과를 보였으며, 특히 헥산 분획물에서 높은 항아메바 효과가 관찰되었다(도 3 참조). 사람 망막세포인 ARPE-19에 대해서는 특별한 세포독성을 보이지 않았다.

도면

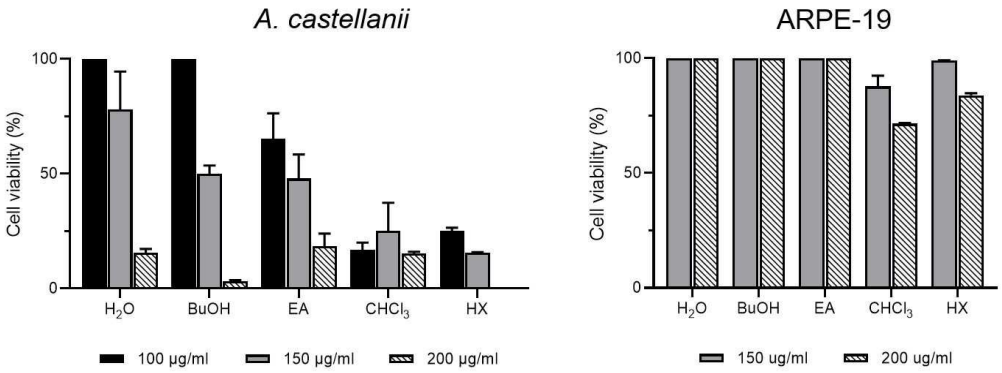
도면1



도면2


0 μg
20 μg
50 μg
Nucleus
Uncharacterized vacuoles
Mitochondria
Uncharacterized vacuoles
Mitochondria
Mitochondria
Uncharacterized vacuoles
Mitochondria
2 um
2 um
2 um
1 um
2 um
1 um

도면3


A. castellanii
ARPE-19
Cell viability (%)
100
50
0
H2O
BuOH
EA
CHCl3
HX
100 μg/ml
150 μg/ml
200 μg/ml
150 ug/ml
200 ug/ml